

# スルメイカ外套膜筋のH-メロミオシンとサブフラグメント-1の Ca感受性

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	5011
掲載ページ	p. 1889-1896
発行年月	1984年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## スルメイカ外套膜筋の H-メロミオシンとサブフラグメント-1 の Ca 感受性

神谷 慎一・今野 久仁彦

(1984 年 3 月 24 日受理)

### Calcium Sensitivity of H-meromyosin and Subfragment-1 from Squid Mantle Muscle

Shin-ichi KAMIYA\* and Kunihiko KONNO\*

H-meromyosin (NMM) and subfragment-1 (S-1) were prepared from squid myosin by digestion with trypsin, chymotrypsin or papain. The chymotryptic and papain HMM and S-1 maintained intact regulatory light chain (R-LC), whereas R-LC in tryptic HMM and S-1 was slightly degraded. As far as pH, KCl and temperature dependencies of Ca-, EDTA-, and Mg-ATPase activities are concerned, these HMM and S-1 preparations were virtually identical with native squid myosin. Squid HMM and S-1 showed a significant difference in Ca-sensitivity; the Mg-ATPase activity of S-1 was insensitive to Ca, whereas the activity of HMM was very sensitive. Furthermore, the addition of F-actin to HMM and S-1 did not change the Ca-sensitivity of Mg-ATPase. Double reciprocal plots of the actin-activated Mg-ATPase against free actin concentration indicated that the affinity of HMM to actin is unaffected by Ca but the maximal activity is distinctly increased by Ca. On the other hand, both the affinity of S-1 to actin and the maximal activity of acto-S-1 were unaffected by Ca. These results confirmed that the primary role of R-LC is to inhibit Mg-ATPase activity of myosin and not to inhibit actin-myosin binding. R-LC is supposed to lose biological functions when S-1 is derived from squid myosin.

脊椎動物の筋収縮の Ca 制御はアクチン側に連結した系であるのに対し、無脊椎動物に属する軟体類の筋肉においてはミオシン側に連結していることが知られている。<sup>1-3)</sup>すなわち、軟体動物筋肉では Ca イオンがミオシンに直接結合し、それが発端となって収縮反応に移行するというものである。そこで著者らは従来よりスルメイカのミオシン側に連結した制御機構について研究を行ってきた。そして、ミオシンの制御軽鎖 (R-LC) の役割はを結合、解離することによって、ミオシン分子自身の性質を調節することであり、それはミオシン Mg-ATPase 活性の Ca による調節という反応として観察されることを報告した。<sup>4-6)</sup>本研究では、ミオシンに連結した Ca 制御機構をさらに詳しく研究するために、Mg-ATPase 活性とアクチンとの結合能などフィラメント形成以外の生物学的性質のほとんどを保有しているミオシンの活性分子断片である H-メロミオシン (HMM) およびサブフラグメント-1 (S-1) を調製し、その生化学的性

質を明らかにすると共に、Ca 感受性について検討しようとした。しかし、スルメイカの HMM や S-1 を調製する標準的な方法は未だに確立されていない現状にあるため、著者らは、まず初めに、イカのミオシンまたは HMM を出発原料として、それらをトリプシンの他にキモトリプシンおよびパパインを用いてそれを生産するための最適条件を探し出し、続いて、これらの標品の生化学的性質を研究し、その結果から、イカミオシンの Ca 制御作用における生化学的役割について解明しようとした。

#### 実験方法

スルメイカ *Todarodes pacificus* からのミオシンの調製は木村らが報じた方法に従って行なった。<sup>7)</sup>ウサギ骨格筋アクチンの調製は SPUDICH-WATT の方法によって行なった。<sup>8)</sup>スルメイカ外套膜筋ミオシンから種々のプロテアーゼによる HMM および S-1 の調製の方法

\* 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

略語: SDS, sodium dodecyl sulfate; PMSF, phenylmethyl-sulfonyl fluoride; IAA, monoiodo acetic acid; DTT, dithiothreitol; EGTA, ethyleneglycol bis ( $\beta$ -aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetate; HC, heavy chain; LC, light chain.

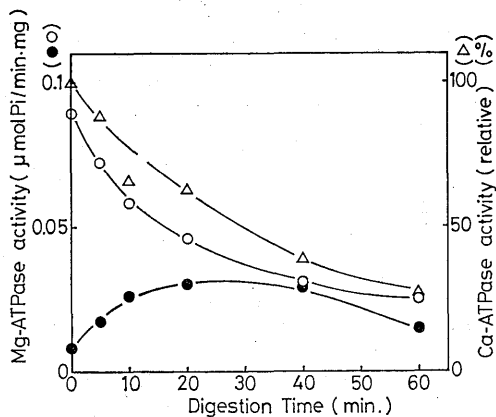


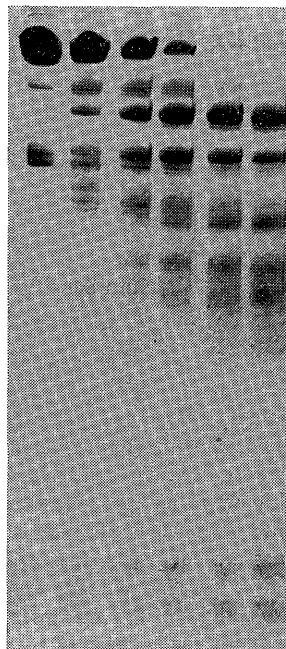
Fig. 1. Changes in Ca-, and Mg-ATPase activities of squid myosin during chymotryptic digestion.

Squid myosin was digested at 20°C by chymotrypsin in an amount of 1/500 (w/w) relative to myosin for various periods. The digestion was stopped by adding 0.2 mM PMSF and used for ATPase assay. The assay was carried out at 20°C in a reaction mixture containing 0.5 M KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, and 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH 7.5) for Ca-ATPase (A), and 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> with either 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> (A) or 0.5 mM EGTA (A) and 1 mM ATP, 20 mM Tris-maleate (pH 6.8) for Mg-ATPase.

については実験結果の項に詳しく述べる。ATPase 活性を測定するための反応液組成は、各図表の説明文中に示した。また、生成した無機リン酸量は、FISKE-SUBBAROWの変法で比色定量した。<sup>9)</sup> SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は LAEMMLI らの方法に従って、0.1% SDS を含む 10% ポリアクリルアミドスラブゲルを用いて行なった。<sup>10)</sup> また、たんぱく質の染色は Coomassie Brilliant Blue R で行なった。たんぱく質濃度の測定は、牛血清アルブミン画分 V を標準としビュレット法により比色定量した。<sup>11)</sup> トリプシンの濃度は、 $E_{280nm}^{1\%} = 15.4$ 、キモトリプシンの濃度は、 $E_{282nm}^{1\%} = 20.5$ 、パパインの濃度は、 $E_{278nm}^{1\%} = 25.0$  を使用して算定した。<sup>12)</sup>

### 実験結果

キモトリプシン、パパインまたはトリプシンによるイカのみオシンの消化 著者らは、先にイカのみオシンをトリプシン消化して HMM を生成する試みについて報告した。<sup>13)</sup> 本研究では S-1 を調製することを目的とした。ウサギ骨格筋ミオシンから S-1 を調製するためキモトリプシンが用いられているので、ここでも適用した。<sup>14)</sup> 初めに、消化の至適条件を見出すためキモトリブ



0 5 10 20 40 60  
Digestion Time (min.)

Fig. 2. Changes in subunit composition of squid myosin during chymotryptic digestion, as revealed by SDS-polyacrylamide slab gel electrophoretic pattern.

Myosin was digested for various periods under the same conditions as in Fig. 1. SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis of the digest was carried out by the method of LAEMMLI (ref. 10) with the use of gels containing 10% polyacrylamide and 0.1% SDS.

シン消化中におけるミオシンの性状の変化を検討した。すなわち、0.5M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) 液中のみオシンに対し、1/500 重量のキモトリプシンを加えて 20°C で消化を開始し、経時的に消化物の一部を取り出して、終濃度で 0.2 mM の PMSF を加えて消化を停止させた。その後、消化ミオシンの Ca-ATPase 活性および Mg-ATPase 活性の Ca 感受性を測定した。その結果を Fig. 1 に示す。これによると、Ca-ATPase 活性は徐々に低下し、60 分後には約 25% まで低下した。また、Ca 存在下の Mg-ATPase 活性も徐々に減少する傾向を示しているが、Ca 非存在下の活性は逆に上昇し、約 30 分後に Ca 感受性が失われていることを示した。

次に、この消化中におけるミオシンの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図の変化を Fig. 2 に示した。これによると、ミオシンの HC は経時的に減少してゆ

Table 1. Proteolytic conditions for producing S-1 and HMM

Protease (a)	Starting material (b)	Digestion			Inhibitor
		a/b (w/w)	Temp. (°C)	Time (min)	
Trypsin	HMM	1/100	10	10	Trypsin inhibitor
Chymotrypsin	Myosin	1/500	20	10	PMSF
Papain	Myosin	1/300	20	10	IAA

き、それに伴い、分子量 10 万に相当する成分の生成が起こることを示した。また、2 種の LC は、いずれも消化されることなく保持されていた。これらの結果から、イカミオンから S-1 を得るためのキモトリプシンによる消化の条件は ATPase の活性中心およびその近傍の破壊がそれほど起こらずに HC 分解が割合に良く進み、しかもまた、結果には示さないが、たんぱく質の収量が高いなどの理由から、10 分間の消化時間を採用することにした。

また、パパインもウサギ骨格筋ミオンから S-1 の調製に用いられるので、<sup>15)</sup> パパインによるミオンの消化の条件をキモトリプシンを用いた場合に準じて、検討した。その結果は図示しないが、消化中における Ca-ATPase および Mg-ATPase 活性の変化および SDS ゲル電気泳動図の変化を総合して、消化条件はミオンの 1/300 (w/w) のパパインを用いて 20°C で 10 分間消化することが適しているという結果となった。なお、パパインは SH 酵素であるので、消化は 1 mM DTT 存在下で行ない、消化反応は終濃度 5 mM の IAA を加えて

停止した。

なお、トリプシンを用いて、ミオンを消化して S-1 を得ようとしたが、この場合は、すでに述べたように最初に HMM だけが生成され、なお、消化を続けても S-1 の生成がほとんどおこらないので、方法としては不適當であることがわかった。そこで、トリプシン消化によって調製したイカの HMM を出発物質とし、高濃度のトリプシンで消化することにした。この後、混入しているトリプシンおよびトリプシンインヒビターは Sephacryl S-300 のゲル透過で除いた。この方法について種々検討した結果から、HMM に対し、重量比で 1/100 のトリプシンを加えて 10°C で 10 分間消化すれば良いことが示された。すなわち、以上 3 種のプロテアーゼによる消化の場合、いずれも Ca-ATPase 活性の変化および Ca 感受性の消失等はほぼ同じ程度におこるように消化条件を決定した。それらをまとめて Table 1 に示す。

**HMM および S-1 の精製** 以上、決定した条件に従って、3 種のプロテアーゼで消化した後、水溶性画分を集めた。すなわち、ミオンを出発物質とした場合

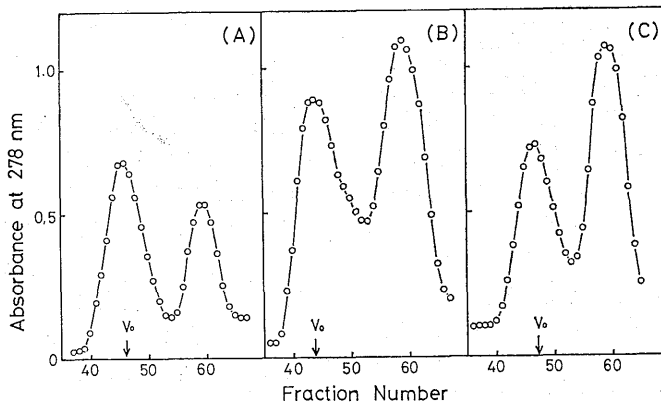


Fig. 3. The elution profiles in Sephacryl S-300 gel filtration of the soluble fractions obtained from tryptic digest of HMM, chymotryptic or papain digest of myosin.

The soluble fractions were obtained from the tryptic digest of HMM (A), chymotryptic digest (B) or papain digest of myosin (C). The conditions for digestion are given in Table 1. The digests were dialyzed against 0.05 M KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), centrifuged at 100,000 × g for 2 h, and the supernatants were used as "soluble fractions". Sephacryl S-300 gel filtration was conducted in 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) by using a 2.6 × 90 cm column. The flow rate was about 12 ml/h, and 4.8 ml/tube were collected. The arrow (V<sub>0</sub>) indicates the void volume.

は消化物を 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に対して透析後, 超速心分離によって上清に得た。一方, HMM を出発物質とした場合は, 消化物をそのまま, いずれも Sephacryl S-300 のゲル透過に供した。その溶出図型を Fig. 3 A, B, C に示した。これによると, いずれのプロテアーゼによる消化物の場合も 2 つの画分に分離され, ひとつは void volume に他のひとつは溶出位置が  $V_0/V_0$  として 1.35 付近に溶出した。分子量から判断して前者は HMM また, 後者は S-1 と見なした。この条件で得た消化物中の HMM と S-1 の量比はトリプシンによる消化では HMM の方が多く, キモトリプシンやパペインによる消化では, いずれも S-1 の方が 60–65% を占め, S-1 の収量が良いことを示した。以下, 本文中では, そのプロテアーゼの種類を略号としてトリプシン (T), キモトリプシン (CT) およびパペイン (P) を用い, さらにそのプロテアーゼで調製した HMM および S-1 標品を区別して, 例えば, トリプシンで得た HMM は HMM(T) のように記述することとし, それらの生化学的性質, 特に Mg-ATPase 活性の Ca-感受性について比較検討した。

**HMM および S-1 標品のサブユニット組成** 調製した 3 種の HMM と S-1 標品のサブユニット組成を知るため, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない, その結果を Fig. 4 に示す。これによると, 3 種の HMM の有するポリペプチド組成はそれぞれ異なり, HC を成すポリペプチド鎖内の開裂の度合が異なることを示したが, 特にトリプシン消化による開裂が激しく, HMM(T) 中の HC 由来のポリペプチドの主なものは 74 K, 60 K, 51 K, と 45 K の 4 種であり, これは以前著者らが報告したイカ HMM が有しているポリペプチドのうち 74 K, 60 K 成分がさらに低分子量化したことを示している。なお HMM(CT) では主として 150 K, 66 K, 60 K の 3 種のポリペプチドよりなり, また, HMM(P) では 150 K, 79 K, 66 K の 6 つのポリペプチドよりなり内部開裂をあまり受けていないことを示す。一方, LC 成分については HMM(CT), HMM(P) ではミオシンの場合と全く変わらないが, HMM(T) では LC-1 は変わらないが LC-2 が低分子の成分に変わっているのが特徴であった。また, S-1 標品については S-1(CT) または S-1(P) のいずれも HC に由来する 100 K のポリペプチド 1 本から成っており, また, 2 種の LC は分解されず完全に残っていることを示した。しかし, S-1(T) は HMM(T) の場合と同様に HC 鎖内の開裂が大きく, 少なくとも 3 種の低分子量のポリペプチド (45 K, 26 K, 22 K) に変化し, また LC-2 も HMM(T) の場合と同様に低分子化していた。これらのことから, 本実験で得たイカの HMM および

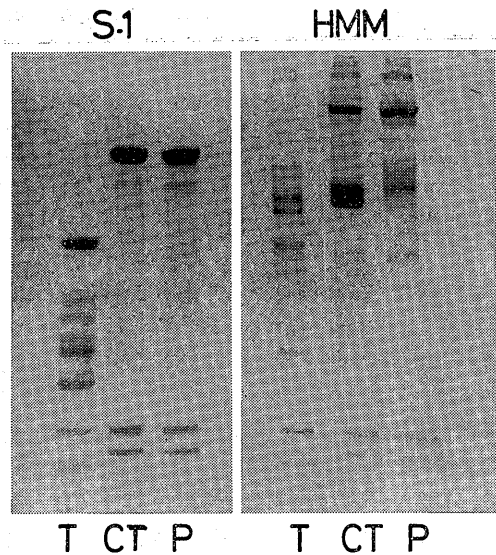


Fig. 4. SDS-polyacrylamide slab gel electrophoretic patterns of three kinds each of S-1 and HMM.

Three kinds of S-1 and HMM were prepared by tryptic, chymotryptic and papain digestion as described in Fig. 3. HMM and S-1 were contained in the first ( $V_0$ ) and second peak in Fig. 3, respectively. T, CT and P indicate the preparations obtained by tryptic, chymotryptic and papain digestion, respectively.

S-1 のサブユニット組成はキモトリプシンまたはパペイン消化によって調製した標品ではともに良く似ているが, トリプシンによって調製した標品だけは著しく異なり, 特に LC-2 が低分子化していることが明らかになった。

**HMM 標品の ATPase 活性とその Ca 感受性** 次に, 3 種の HMM 標品の ATPase 活性を比較した。すなわち, ここでは Ca-, EDTA- および Mg-ATPase 活性の KCl 濃度依存性を調べた結果を Fig. 5 に示す。これによると, 3 種類の HMM 標品の Ca-, EDTA- および Mg-ATPase の比活性はそれぞれ異なるが, いずれも同じ KCl 濃度依存性を示した。すなわち, Ca-ATPase 活性は 0.1 M KCl 付近で高く, EDTA-ATPase 活性は高 KCl 濃度側で高く, また, Mg-ATPase 活性は 0.3~0.4 M KCl で最大になった。この性質は, すでに報告したイカのミオシンや HMM(T) の場合と良く類似している。

なお, 低 KCl 濃度において Mg-ATPase 活性は相対的に高い Ca 感受性を示し, かつ高い KCl 濃度で Ca 感受性を失なう傾向を示した。これはいずれの HMM 標品でも同様であり, その点では使用したプロテアーゼの種類による差は認められなかった。また, HMM(T) では

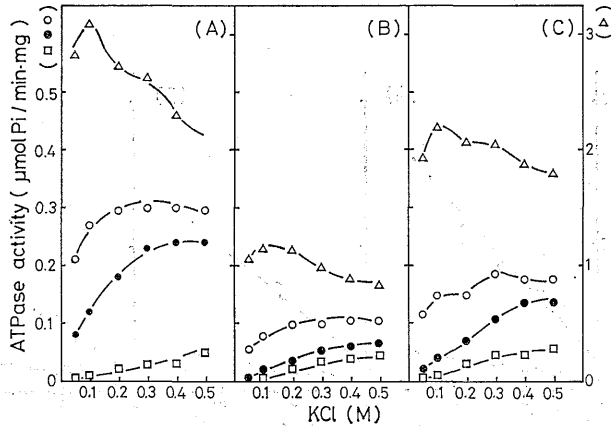


Fig. 5. KCl concentration dependence of ATPase activity of the three kinds of squid HMM.

The ATPase assay was carried out at 20°C in the presence of various concentrations of KCl. The reaction mixture contained 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 5 mM CaCl<sub>2</sub> (Δ, for Ca-ATPase) or 5 mM EDTA (□, for EDTA-ATPase) or 20 mM Tris-maleate (pH 6.8), 1 mM ATP, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and either 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> (○) or 0.5 mM EGTA (●) for Mg-ATPase. (A) tryptic HMM, (B) chymotryptic HMM, (C) papain HMM.

LC-2 が明らかに低分子化しているにもかかわらず、高い Ca 感受性を示すので、この LC の断片にも Ca 制御作用を示す機能があることが示唆される。なお、HMM(CT) または HMM(P) は HMM(T) に比べて、ATPase の比活性が全体に低かった。従って HC を成すポリペプチド鎖内の開裂の程度の大いものの方が、活性が高い理由は不明であるが、おそらく活性中心が選択的に影響を受けなかったためであると考えられる。

なお、HMM の ATPase 活性については、KCl 濃度の他に pH 依存性および温度依存性についても検討したが、KCl 濃度依存性の場合と同じく、3 種の HMM 標品の間では本質的な差がなく、また、いずれの標品もその Mg-ATPase 活性の Ca 感受性を明らかに示した。

HMM 標品の Mg-ATPase のアクチンによる活性化と Ca 感受性 次に、3 種の HMM 標品のアクチンとの結合能を HMM·Mg-ATPase のアクチンによる活性化から求め、同時にそれに対する Ca の影響についても検討した。すなわち、種々濃度のアクチン存在下で HMM の Mg-ATPase 活性を Ca 存在下および非存在下で測定した。そして、アクチン濃度と ATPase のアクチン活性化の度合について両逆数プロットを行ない、その結果を Fig. 6 に示した。そして、横軸との交点からアクチンとの親和性 (Ka) および縦軸の切点から最大活性をそれぞれ求めた。これによると、アクチンとの結合能を反映している Ka については、いずれの HMM 標品についても、また、Ca の有無による差がなく等値を示した。この結果は、HMM とアクチンとの結合は Ca の影響を受けないことを示しており、また、3 種の HMM

中のアクチンとの結合部位は、プロテアーゼ処理中割合よく保護されていたと推定される。一方、 $V_{max}$  には Ca が影響し、Ca 存在下で大きく、そして Ca 非存在下で小さな値を示した。これらの結果は、3 種の HMM 標品は Ca と結合し、その Mg-ATPase を活性化するのであるが、アクチンとの結合能は同じであることを示している。従って、HMM の Mg-ATPase 活性は、Ca で活性化される分だけアクチンによって活性化を受けるようになり、結果として見かけ上  $V_{max}$  が Ca によって影響を受けて上昇するようになると考えられる。ただし、HMM(T) 比べ、HMM(CT) および HMM(P) は Ca による影響の受け方は本質的に同じだが、前者の  $V_{max}$  値は非常に小さかった。

S-1 標品の Mg-ATPase 活性とその Ca 感受性 次に、3 種の S-1 標品の ATPase 活性を比較した。ここでも、HMM の場合と同様に活性の KCl 濃度依存性を比較し、結果を Fig. 7 に示す。この結果から明らかのように、3 種の S-1 の ATPase 活性の KCl 濃度依存性にほとんど差が認められなかった。また、この 3 種の S-1 標品では、HMM の場合に見られたような比活性の相違は見られず、ほぼ同じ値であった。従って、先に、Fig. 5 に示した通り、トリプシン消化で得た S-1 はそのペプチド鎖が著しく内部開裂を起こしているのがあるが、これは ATPase 活性に影響をおよぼさないことが示された。この結果も HMM の場合と良く似ていた。しかし、S-1 の Mg-ATPase 活性は、Ca 存在下でも Ca 非存在下でも全く同じ値を示し、Ca 感受性は低 KCl 濃度範囲でさえも検出されないの、この点は

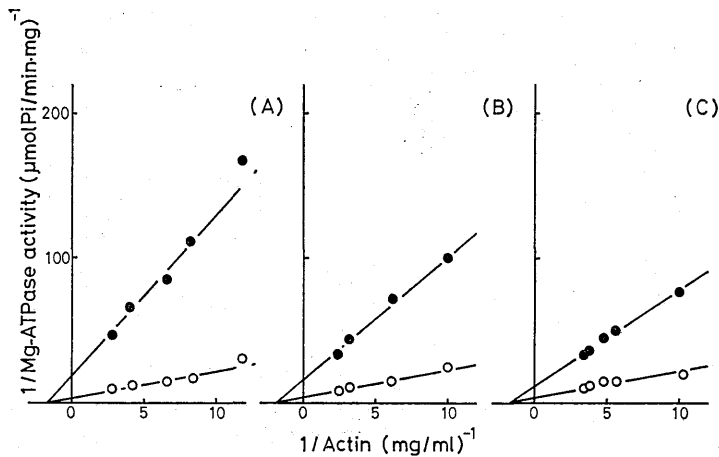


Fig. 6. Double reciprocal plots of Mg-ATPase activity of three kinds of squid HMM against free actin concentration.

The ATPase assay was carried out in a reaction mixture containing 15 mM KCl, 20 mM Trismaleate (pH 6.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, and either 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> (○) or 0.5 mM EGTA (●). Various concentrations (0–0.5 mg/ml) of rabbit F-actin and definite concentration (0.1 mg/ml) of HMM were used. In the double reciprocal plots of activity, ATPase activity was expressed as (acto-HMM ATPase–HMM ATPase). (A) tryptic HMM, (B) chymotryptic HMM, (C) papain HMM.

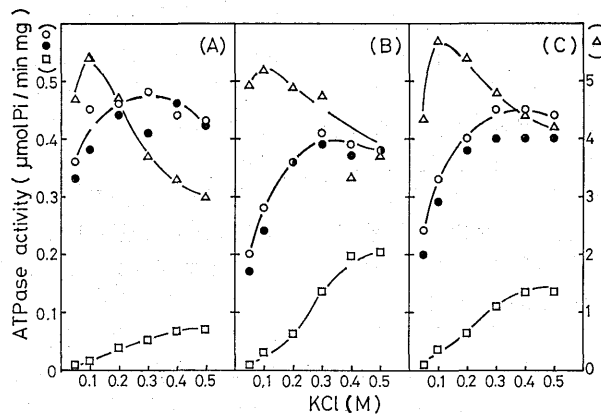


Fig. 7. KCl concentration dependence of the ATPase activity of three kinds of squid S-1.

The ATPase assay was carried out under the same conditions as in Fig. 5. The same symbols as in Fig. 5 were used. (A) tryptic S-1, (B) chymotryptic S-1, (C) papain S-1.

HMM やミオシンの性質とは大きく異なっていた。

なお、ATPase 活性の pH および温度依存性も、3 種の S-1 標品の間で同じ傾向を示し、しかもミオシンのそれらと良く一致する結果を示したが、いずれの条件下でも Mg-ATPase には Ca 感受性が検出されない点には変わらなかった。

**S-1 標品の Mg-ATPase のアクチンによる活性化と Ca 感受性** Fig. 7 の結果では、S-1 単独の Mg-ATPase 活性には Ca 感受性が検出されないことを示したが、次にアクチンとの結合に対して Ca の影響があるかどうか

を HMM の場合と同様に Mg-ATPase のアクチンによる活性化の度合から検討した。その結果を、HMM と同じようにアクチン濃度と活性値の両逆数プロットとして、Fig. 8 に示した。これによると、いずれの S-1 標品もアクチンにより活性化を受けるが、Ca の有無によって Ca 感受性は検出されなかった。さらに、3 種の S-1 標品とアクチンとの結合能を  $K_a$  として比べると、Ca の有無による相違はやはり認められず、しかも  $V_{max}$  の値もほとんど差が認められなかった。

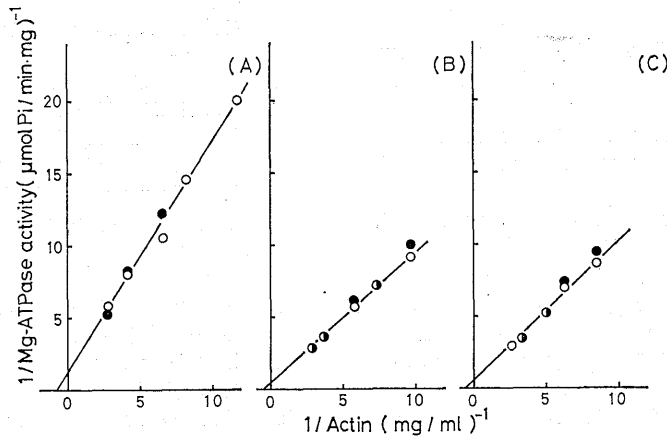


Fig. 8. Double reciprocal plots of Mg-ATPase activity of three kinds of squid S-1 against free actin concentration.

The ATPase assay was carried out under the same conditions as in Fig. 5. The same symbols as in Fig. 6 were used. (A) tryptic S-1, (B) chymotryptic S-1, (C) papain S-1.

## 考 察

軟体動物筋肉におけるミオシン連結の Ca 制御作用は、試験管内ではミオシン単独の Mg-ATPase 活性が Ca によって調節される現象として観察できる。そこで、このミオシンの Ca 制御機構を研究するには生理的塩濃度で不溶性であるミオシンよりも水溶性の HMM および S-1 を用いる方が好都合であり、実際に広く重用されている。先に、著者らもスルメイカミオシンからトリプシン消化によって HMM を調製し、その生化学的性質を検討した。<sup>13)</sup> 本研究では、さらに小さい活性分子断片である S-1 を各種のプロテアーゼを用いて調製し、その生化学的性質を検討した。その結果、HMM および S-1 標品の ATPase の性質は、いずれもミオシンのそれに良く似ており本質的に全く同じであるのに対して、HMM の Mg-ATPase 活性は Ca 感受性を示し、S-1 のそれには Ca 感受性がないという点で重大な相違が見出された。この違いは HMM と S-1 を調製する時のプロテアーゼの種類を変えても変わらず、いずれの HMM 標品も Ca 感受性を示し、S-1 標品では例外なく Ca 感受性が消失していることを認めた。すでに、A.G. SZENT-GYÖRGYI らは、ホタテのミオシンをパパインで消化して得た S-1 とウサギの純粋なアクチンとから構成したアクト-S-1 には Ca 感受性がないことを報告しているが、<sup>2)</sup> 本研究の結果から S-1 それ自体の Mg-ATPase 活性に Ca 感受性がないことが明らかになった。

著者らは、従来からミオシン連結の Ca 制御作用における R-LC の生理的な役割は Ca 非存在下においてミオシン Mg-ATPase 活性の抑制を行なうことにあり、それが制御の基本反応であると主張してきた。<sup>4-6)</sup> 本研究の結果から、S-1 標品はその R-LC を完全に保持し

ているにもかかわらず、制御作用を失なっていることが示されたので、R-LC がその制御作用を示すための条件は、それがただ存在するだけでは不十分であることが示唆された。従って、制御作用が働くためには、HMM が S-1 に変わる際にある特定の成分が失なわれることに由来するか、または、HMM と S-1 の構造の違いそのものが制御作用の発現に関与しているのかのいずれかであるように考えられる。しかし、感受性を示さない S-1 標品に対してアクチンを加えても、やはり Ca 感受性を示さないという事実はミオシン単独の Ca 感受性とその制御作用の本質であるという主張が妥当である。

また、本研究の結果からアクチン活性化 Mg-ATPase を指標として検討する限り Ca の有無は HMM や S-1 のアクチンとの結合について影響を与えないことが示されたので、軟体動物筋肉における Ca 制御作用は、ミオシンとアクチンの結合が Ca によって調節されることにあるという考え方は妥当ではなく、むしろミオシン自体の ATPase が Ca によって活性化されるに従ってアクチンによる活性化も拡大されるという従来の考え方を支持する結果となった。従って、このスルメイカの HMM と S-1 標品の性質上の相違をさらに詳しく研究することにより、スルメイカミオシンの Ca 制御の分子機構がより明らかになると考えられる。

本研究を遂行するに当り、懇切な御指導を賜った本学部新井健一助教授に感謝いたします。また、この研究は文部省科学研究費補助金によったのでここに記して感謝いたします。

## 文 献

- 1) J. KENDRICK-JONES, W. LEHMAN, and A. G. SZENT-GYÖRGYI: *J. Mol. Biol.*, **54**, 313-326



- (1970).
- 2) A. G. SZENT-GYÖRGYI, E. M. SZENTKIRALYI, and J. KENDRICK-JONES: *J. Mol. Biol.*, **74**, 179-203 (1973).
  - 3) J. KENDRICK-JONES, E. M. SZENTKIRALYI, and A. G. SZENT-GYÖRGYI: *J. Mol. Biol.*, **104**, 747-775 (1976).
  - 4) T. ASADA, G. ASHIBA, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **85**, 1543-1546 (1979).
  - 5) K. NISHITA, T. OJIMA, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **86**, 663-673 (1979).
  - 6) K. KONNO: *J. Biochem.*, **84**, 1431-1440 (1978).
  - 7) 木村 郁夫・吉富 文司・今野 久仁彦・新井 健一: 日水誌, **46**, 885-892 (1980).
  - 8) J. A. SPUDICH and S. WATT: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866-4871 (1971).
  - 9) 高橋泰常: 生化学の領域における光電比色法, 各論 2 (関根隆光編), 南江堂, 東京, 1962 年, pp. 13-14.
  - 10) U. K. LAEMMLI and M. FAVRE: *J. Mol. Biol.*, **80**, 579-599 (1973).
  - 11) A. G. GORNALL, C. T. BARDWILL, and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
  - 12) F. J. KEZDY and E. T. KAISER: in "Methods in Enzymology" (ed. by G. E. PERLMANN and L. LEONARD), Vol. 19, Academic Press, New York, 1970, p. 73.
  - 13) 吉富文司・神谷 慎一・今野 久仁彦: 日水誌, **50**, 1555-1559 (1984).
  - 14) A. G. WEEDS and R. S. TAYLOR: *Nature*, **257**, 54-60 (1975).
  - 15) S. S. MARGOSSIAN, S. LOWEY, and B. BARSHOP: *Nature*, **258**, 163-166 (1975).